

## КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ТАРГЕТНЫХ ПАНЕЛЕЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕОАНТИГЕННОГО ПРОФИЛЯ ОБРАЗЦОВ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ И ПРЯМОЙ КИШКИ

*А.В. Каныгина<sup>1\*</sup>, Е.И. Шарова<sup>1</sup>, Р.И. Султанов<sup>1</sup>, Ю.А. Шелыгин<sup>2</sup>,  
Ю.В. Долудин<sup>3</sup>, Е.С. Кострюкова<sup>1</sup>, Э.В. Генерозов<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,  
119435, Москва, Малая Пироговская, 1а; \*эл. почта: kanygina@rscpm.org

<sup>2</sup>Государственный научный центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих, 123423, Москва, ул. Саляма Адила, 2

<sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова  
(Сеченовский университет), 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Иммунотерапевтические подходы к лечению онкологических заболеваний являются многообещающим стремительно развивающимся направлением. Одним из методов персонализированной адъювантной иммунотерапии является стимулирование иммунного ответа на мутантные белки опухоли с помощью препаратов на основе неоантигенных пептидов, синтезируемых опухолевыми клетками в результате появления соматических мутаций в их геноме. Технологии скрининга индивидуальных для пациента и потенциально неоантигенных мутаций основаны на высокопроизводительном секвенировании, чаще всего опухолевого экзосомы, что является сложной и дорогостоящей процедурой. Возможным альтернативным решением является использование для секвенирования таргетных панелей, ограниченных избранными генами. Применение таких панелей может быть более приемлемым и в тех случаях, когда по тем или иным причинам не удаётся получить достаточное количество опухолевой ДНК. Мы оценили потенциал применения таргетных панелей онкологической направленности для детекции неоантигенных соматических вариантов при колоректальном раке (аденокарцинома толстой и прямой кишки). Применяемые в клинической практике методы детектирования некоторых частых соматических вариантов не позволяют получить неоантигенный профиль опухоли, достаточный для дизайна эффективного препарата в случае мало- и среднемутированных раков, к которым относится колоректальный рак. Проведённый нами анализ 11 доступных таргетных панелей, отличающихся по числу охватываемых ими генов, показал, что как большой размер панели, так и специализация состава панели под конкретное заболевание (колоректальный рак) не даёт принципиальных преимуществ при оценке индивидуального неоантигенного профиля. Оптимальным для данной задачи является использование онкопанелей общего профиля, содержащих среднее (2300-11200) количество ампликонов и/или охватывающие 150-600 генов. Такие панели позволяют детектировать достаточное количество иммуногенных эпитопов (>3) для доли пациентов, превышающей показатель в 30-50%.

**Ключевые слова:** колоректальный рак; неоантигены; иммунотерапия; секвенирование; таргетные панели

**DOI:** 10.18097/PBMC20186406517

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время значительное развитие получают иммунотерапевтические подходы к лечению онкологических заболеваний, в частности, метастатических раков различной локализации. В основе такой терапии лежит стимулирование иммунного ответа на мутантные белки, синтезируемые опухолевыми клетками в результате появления соматических мутаций в их геноме. Известно, что в клетках опухоли могут реализовываться различные механизмы избегания иммунного ответа, например, опухоль-индуцированные иммунологические барьеры, нарушение презентации антигенов в клетках опухоли, низкая инфильтрация опухоли клетками иммунной системы и др. [1]. Некоторые опухоли (меланома, рак лёгкого и др.) характеризуются высокой соматической мутационной нагрузкой и поэтому перспективны для снятия антителами опухоль-индуцированных иммунологических барьеров, то есть терапии так называемыми ингибиторами контрольных точек (анти-PD-1, анти-PD-L1, анти-CTLA-4 и др.) [2, 3]. Опухоли с меньшей

мутационной нагрузкой (рак предстательной железы, саркома Юинга и др.) дают не такой хороший ответ на неспецифическую иммунотерапию [4] и требуют таргетного подхода с учётом индивидуального мутационно-неоантигенного профиля. Для колоректального рака описаны как гипермутированные молекулярные подтипы опухоли, так и подтипы с низким количеством соматических мутаций. Но, в целом, доля гипермутированных раков невысока (5-10%). В общем пуле соматических мутаций при колоректальном раке у больных наблюдается относительно низкий процент рекуррентных соматических мутаций, то есть мутаций, встречающихся в типичных позициях у многих пациентов [5]. В связи с этим эффективность иммунотерапии анти-PD-1-моноклональными антителами была показана только в случае колоректального рака с микросателлитной нестабильностью (MSI) и нарушениями репарации ДНК (MMR deficiency) [6]. Однако данный статус опухоли наблюдается лишь у небольшой части пациентов (около 5% и 15%, соответственно) [6, 7]. В остальных случаях такая терапия может быть эффективна лишь

\* - адресат для переписки

в сочетании с персонализированными подходами, направленными на активацию иммунного ответа на конкретные антигены опухоли.

В настоящее время активно разрабатываются комплексные индивидуализированные препараты на основе антигенных пептидов – фрагментов белков, присутствующих в клетках опухоли, или таргетной терапии на основе противоопухолевых клонов цитотоксических Т-клеток. В данном случае антигенами могут являться как мутантные, так и немутантные опухолевые белки. Для колоректального рака возможно применение терапии, стимулирующей иммунный ответ на ряд собственных (немутантных) антигенов, в частности, на раковый эмбриональный антиген (СЕА); однако такой подход сопряжен с высоким риском развития аутоиммунной реакции в виде острого колита [8]. Подход с использованием индивидуальных мутантных пептидов продемонстрировал эффективность в ряде гипермутированных раков, в частности, при адъювантной терапии пациентов с метастатической меланомой [9]. Для колоректального рака была показана эффективность прямой вакцинации иммуногенными мутантными пептидами в экспериментах на животных [10]. Для некоторых других раков, в частности, метастатического рака молочной железы, была показана эффективность терапии отобранными и размноженными *in vitro* клонами цитотоксических Т-клеток против конкретных неоантигенных опухолевых пептидов [11]. Так как количество рекуррентных мутаций при колоректальном раке относительно невысоко и соответствующие мутантные пептиды в каждом конкретном случае не обязательно могут являться иммуногенными, наиболее перспективным является персонализированный подход дизайна препарата или отбора клонов Т-клеток в соответствии с мутационным профилем опухоли пациента.

Таким образом, на первый план при реализации такого подхода выходят методы анализа мутационной/неоантигенной нагрузки опухолевых клеток, полученных из образца первичной опухоли или метастаза после их резекции/биопсии. При недоступности материала первичной опухоли или метастаза, мутационный профиль опухоли возможно установить, исследуя циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), если они выявляются в крови пациента. Кроме того, для некоторых онкозаболеваний в плазме крови и/или в моче (рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, почки, яичка) может обнаруживаться и внеклеточная опухолевая ДНК [12, 13]. Современные технологии пробоподготовки позволяют использовать ДНК, выделенную из ЦОК, и внеклеточную ДНК для идентификации соматических мутаций разными методами.

Наиболее информативные методы для определения спектра соматических мутаций основаны на применении технологий секвенирования нового поколения (NGS – next generation sequencing). Следует отметить, что идентификации ограниченного набора соматических мутаций в отдельных часто мутирующих генах (*KRAS*, *PIK3CA* и др.), как правило, недостаточно.

Это обусловлено как недостаточно высокой распространённостью вариантов, так и их потенциальной слабой иммуногенностью. Так, для наиболее распространённых негипермутированных подтипов колоректального рака, самые частые мутации в гене *KRAS* обнаруживаются не более, чем у 43% пациентов, а в гене *PIK3CA* – у 18% [5]. Кроме того, наличие мутации в каждом конкретном случае не гарантирует иммуногенность соответствующего белка/пептида для комплекса гистосовместимости I класса пациентов, и, как следствие, целесообразность его включения в состав персонализированной пептидной вакцины. В связи с этим возникает необходимость более полного индивидуального типирования мутационного профиля опухолевой ДНК методами высокопроизводительного секвенирования. В этом случае для идентификации соматических мутаций применяется секвенирование полного экзона (кодирующих участков генов) опухолевых клеток пациента в сочетании с секвенированием экзона клеток крови в качестве контроля.

Менее затратным и, как следствие, проще реализуемым в клинической практике является таргетное секвенирование кодирующих участков ограниченного набора генов (в среднем 20-1000), наиболее часто мутированных в данном типе рака или при онкозаболеваниях в целом. Любой из этих подходов дает значительно более информативный результат, чем ПЦР-диагностика отдельных вариантов. При этом использование коммерческих таргетных панелей онкологической направленности выглядит перспективным с точки зрения эффективности и стоимости анализа, как в случае типирования непосредственно опухолевого материала, так и для ЦОК и внеклеточной опухолевой ДНК [14].

На сегодняшний день для исследования мутационных профилей при онкологических заболеваниях доступны десятки таргетных панелей, адаптированных для использования с разными моделями секвенаторов и отличающихся набором исследуемых генов.

В данной работе мы провели биоинформатическую оценку возможности применения 11 коммерчески доступных панелей (9 общего профиля и 2 специализированные для колоректального рака) для анализа неоантигенного профиля образцов аденокарциномы толстой и прямой кишки. Раздельный анализ образцов аденокарциномы толстой и аденокарциномы прямой кишки обусловлен отличиями в спектрах соматических мутаций, ассоциированных с этими разновидностями колоректального рака [15].

## МЕТОДИКА

Все работы были выполнены на открытых данных по соматическим мутациям и экспрессионному профилированию опухолевой ДНК у пациентов с колоректальным раком и на основе информации, предоставленной производителями анализируемых панелей.

*Анализируемые таргетные панели*

Для анализа были выбраны 11 таргетных панелей для NGS секвенирования, предназначенных для изучения мутационного профиля опухолевой ДНК (табл. 1).

*Открытые данные, использованные в анализе*

Для оценки информативности исследуемых панелей были использованы данные, размещённые в базе данных The Cancer Genome Atlas (TCGA) в варианте GDC Legacy Archive (<https://portal.gdc.cancer.gov/legacy-archive>) по соматическим мутациям и профилям экспрессии, детектированным у пациентов со следующими онкологическими заболеваниями:

Аденокарцинома толстой кишки – (COAD), Colon Adenocarcinoma, 421 образец;

Аденокарцинома прямой кишки – (READ), Rectum Adenocarcinoma, 156 образцов.

Данные по соматическим мутациям были получены в виде файлов в формате MAF (Mutation Annotation Format) [16, 17].

Последовательности потенциально иммуногенных эпитопов, предсказанные *in silico* на анализируемых данных по соматическим мутациям, были выгружены из базы данных TCIA (<https://tcia.at>) [18].

Частоты аллелей генов HLA класса I для популяций РФ были получены из базы данных The Allele Frequency Net Database (<http://allelefrequencys.net>) [19].

*Оценка связывания эпитопов с белками главного комплекса гистосовместимости*

Для оценки силы связывания (аффинности) эпитопов с различными вариантами белков HLA класса I использовался алгоритм NetMHCpan 4.0 [20]. В качестве меры аффинности было взято значение концентрации полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ); сильно связывающимися считались эпитопы с предсказанной  $IC_{50} \leq 500$  нМ, слабо связывающимися – эпитопы с  $500$  нМ  $< IC_{50} \leq 1000$  нМ.

*Оценка покрытия панелями неоантигенных мутаций*

Координаты иммуногенных мутаций в геноме человека (сборка hg19) были определены с помощью оригинального скрипта, написанного нами на языке программирования Python, исходя из анализа последовательностей иммуногенных эпитопов, выгруженных из базы данных TCIA для двух типов рака – COAD и READ. Для анализа покрытия панелями неоантигенных мутаций был использован пакет bedtools [21]. Для перевода координат таргетных участков панели SeqCap EZ Human Oncology Panel (“Roche”, Швейцария) со сборки генома hg38 на hg19 была использована утилита hgLiftOver (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>).

*Анализ данных РНК-секвенирования*

Данные РНК-секвенирования проанализированы по схеме, описанной в [22]. Для этого была проведена RPKM (Reads per kilobase per million) – нормализация

Таблица 1. Коммерчески доступные таргетные панели, предназначенные для изучения мутационного профиля опухолевой ДНК, использованные в исследовании

| Анализируемая панель, полное название, сокращённое обозначение |     | Количество:<br>А – ампликонов;<br>Г – генов,<br>покрываемых<br>панелью |     | Тип обогащения:<br>(Гибр.) –<br>гибридизационный;<br>(Ампл.) –<br>ампликонный | Производитель                |
|--|-----|--|-----|---|------------------------------|
|  |     | А  | Г   |   |                              |
| SureSelect NCC Oncopanel                                       | AG1 | 2296   | 113 | Гибр.   | «Agilent Technologies» (США) |
| ClearSeq Comprehensive Cancer                                  | AG2 | 2505   | 151 | Гибр.   | «Agilent Technologies»       |
| ClearSeq DNA Kinome  | AG3 | 11215  | 612 | Гибр.   | «Agilent Technologies»       |
| Ion AmpliSeq™ TP53 Panel                                       | AS1 | 24   | 1   | Ампл.   | «Thermo Fisher» (США)        |
| Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Research Panel v2                 | AS2 | 93   | 22  | Ампл.   | «Thermo Fisher»              |
| Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2                          | AS3 | 207  | 50  | Ампл.   | «Thermo Fisher»              |
| Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer                              | AS4 | 15992  | 409 | Ампл.   | «Thermo Fisher»              |
| GeneRead Human Colorectal Cancer Panel NGHS-002X               | Q1  | 688  | 38  | Ампл.   | «QIAGEN» (Нидерланды)        |
| GeneRead Human Comprehensive Cancer Panel NGHS-501X            | Q2  | 2734   | 160 | Ампл.   | «QIAGEN»                     |
| Roche Comprehensive Cancer                                     | R1  | 22094  | 578 | Гибр.   | «Roche» (Швейцария)          |
| SeqCap EZ Human Oncology Panel                                 | R2  | 32512  | 981 | Гибр.   | «Roche»                      |

количественных данных экспрессии генов в образцах. Считали, что ген экспрессирован в выборке (COAD либо READ) при условии RPKM>1 не менее, чем в 50% образцов этой выборки [22].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Полнота охвата наиболее часто мутированных генов

Определение мутационного профиля опухолевой ДНК пациента является одним из ключевых факторов при разработке таргетных иммунотерапевтических подходов к лечению онкологических заболеваний. С этой точки зрения интерес представляют как рекуррентные соматические мутации, обнаруживаемые существующими унифицированными методиками, так и индивидуальные мутации, которые зачастую наиболее иммуногенны и, как следствие, являются перспективными мишенями для персонализированной терапии. Таким образом, одним из критериев выбора панели для генотипирования опухоли была полнота охвата наиболее часто мутированных генов и отдельных локусов и доля общего спектра соматических мутаций, выявляемых панелью. На уровне молекулярных подтипов в колоректальном раке выделяют гипермутированный подтип CMS1, характеризующийся наличием микросателлитной нестабильности, и другие три подтипа CMS2-4, в среднем не отличающихся большим количеством соматических мутаций [24]. Поэтому оценку панелей с точки зрения эффективности обнаружения потенциально иммуногенных мутаций для этих подтипов проводили отдельно.

Для аденокарциномы толстой и прямой кишки было показано наличие группы генов с существенно повышенной частотой соматических мутаций, из которых наиболее часто мутированными являются гены *APC*, *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *SMAD4*, *TCF7L2*, *NRAS*, *CTNNB1*, *SMAD2*, *FAM123B* и *SOX9* для негипермутированного типа рака и *BRAF*, *ACVR2A*, *APC*, *TGFBR2*, *MSH3*, *MSH6*, *SLC9A9* и *TCF7L2* для гипермутированного типа [5]. Рассматриваемыми панелями (без учёта AS1) охватывается в среднем 50% этих генов (табл. 2). Гены *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *NRAS*, *CTNNB1* и *BRAF* содержатся во всех этих панелях, *APC* – во всех, за исключением AS1 и AS2. Специализированные панели для колоректального рака Q1 и AS2 включают 16 и 8 генов соответственно, AS2 не содержит гена *APC*, наиболее часто мутированного в негипермутированном типе. Среди универсальных онкопанелей 15, 16 и 17 генов охватываются панелями R1, AS4 и R2, соответственно, остальные панели охватывают 10 и менее генов.

Мы провели собственный дополнительный анализ позиций рекуррентных соматических мутаций у пациентов в выборках TCGA COAD и TCGA READ. Для аденокарциномы толстой кишки (COAD) нами были обнаружены делеция в гене *RNF43*, а также точечная мутация в гене *PGM5*, присутствующие у 5% пациентов. Ранее повышенная частота мутирования гена *RNF43* была показана

Таблица 2. Количество генов, часто мутированных в колоректальном раке по данным [5], охватываемых анализируемыми таргетными панелями. Для негипермутированных подтипов рака (CMS2-4) рассматривались гены *APC*, *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *SMAD4*, *TCF7L2*, *NRAS*, *CTNNB1*, *SMAD2*, *FAM123B* и *SOX9*, для гипермутированного подтипа рака (CMS1) – гены *BRAF*, *ACVR2A*, *APC*, *TGFBR2*, *MSH3*, *MSH6*, *SLC9A9* и *TCF7L2*

| Панель | Количество анализируемых часто мутированных генов |             |                  |
|--------|---|-------------|------------------|
|        | Всего   | CMS1 (из 8) | (CMS2-4) (из 12) |
| AG1    | 9   | 1           | 8                |
| AG2    | 9   | 1           | 8                |
| AG3    | 10  | 3           | 7                |
| AS1    | 1   | 0           | 1                |
| AS2    | 8   | 1           | 7                |
| AS3    | 9   | 1           | 8                |
| AS4    | 16  | 5           | 11               |
| Q1     | 16  | 6           | 10               |
| Q2     | 10  | 2           | 8                |
| R1     | 15  | 4           | 11               |
| R2     | 17  | 6           | 11               |

в колоректальном раке и в раке эндометрия [23]. Стоит отметить, что ген *RNF43* присутствует только в панели R2, тогда как ген *PGM5* не входит в состав ни одной из рассматриваемых панелей.

Для негипермутированного типа доля анализируемых генов составляет 60-90% в зависимости от панели (без учёта AS1). Для гипермутированного варианта охват соответствующих ему генов в среднем ниже – 13-75%, что обуславливает менее полное обнаружение рекуррентных соматических мутаций, характерных для данного типа рака, с использованием рассматриваемых панелей. В то же время большое количество мутаций при данном типе рака повышает вероятность обнаружения индивидуальных иммуногенных вариантов в генах, охватываемых панелями, но при этом не характеризующихся высокой частотой мутаций в выборке. В целом, использование таргетных панелей обеспечивает достаточно эффективное детектирование соматических мутаций.

### Индивидуальный профиль соматических мутаций пациентов с колоректальным раком

В качестве меры полноты панели рассматривали долю и число мутантных позиций, охватываемых панелью, от общего числа соматических мутаций, детектируемых у пациента, а также от числа мутаций, попадающих в гены, в среднем экспрессированные в соответствующей выборке. Распределение мутаций смотрели отдельно для молекулярного подтипа CMS1 – (MSI immune, гипермутированный) и группы, объединяющей остальные 3 подтипа (CMS2, CMS3, CMS4) по классификации [24]. Подтип CMS1, который характеризуется наличием микросателлитной нестабильности и гипермутированностью, наблюдается у 13,8% пациентов из выборки COAD (58 из 421)

и у 2,7% пациентов из выборки READ (4 из 156). CMS1 лучше охватывается панелями (по абсолютному значению покрытых мутаций), чем остальные три подтипа (табл. 3). В среднем, для колоректального рака панелями охватывается от 0,1% (AS1) до 10,78% (R2) индивидуального спектра соматических мутаций для аденокарциномы толстой кишки и от 0,7% до 11,98% для аденокарциномы прямой кишки (рис. 1) (табл. S1 приложения).

Анализ охвата абсолютного числа мутаций в экспрессированных генах показал, что большинство панелей позволяют детектировать хотя бы несколько мутаций не менее, чем у 50% пациентов. При этом медиана числа мутаций и величина разброса по пациентам показывают, что вследствие высокой индивидуальной вариабельности доля таких пациентов может быть высокой даже в небольших панелях.

#### Анализ эффективности охвата панелями неоантигенных пептидов

Для анализа потенциальной эффективности обнаружения иммуногенных мутаций при колоректальном раке с использованием рассматриваемых панелей был проанализирован охват мутаций, соответствующих иммуногенным

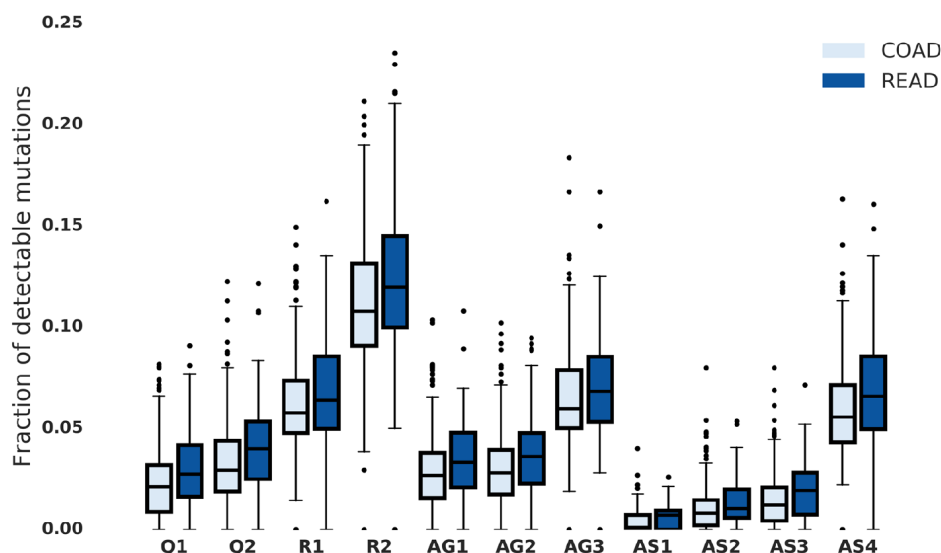
эпитопам, предсказанным для пациентов в выборках COAD и READ (см. раздел “Методика”). В качестве дополнительных критериев эффективности панелей использовались данные по экспрессии генов, в которых выявлялись неоантигенные мутации, распределение эпитопов по аллелям HLA, типичным для РФ, а также данные по минимальному количеству иммуногенных эпитопов, детектируемому для отдельно взятого пациента.

Одним из критичных условий того, что неоантигенный пептид является хорошей мишенью для иммунотерапии, является высокая экспрессия гена, белковым продуктом которого этот пептид является. Данные по количеству предсказанных иммуногенных эпитопов по отношению к их нахождению в экспрессированных и неэкспрессированных генах, покрываемыми анализируемыми панелями, приведены в приложении (табл. S2 и S3 приложения).

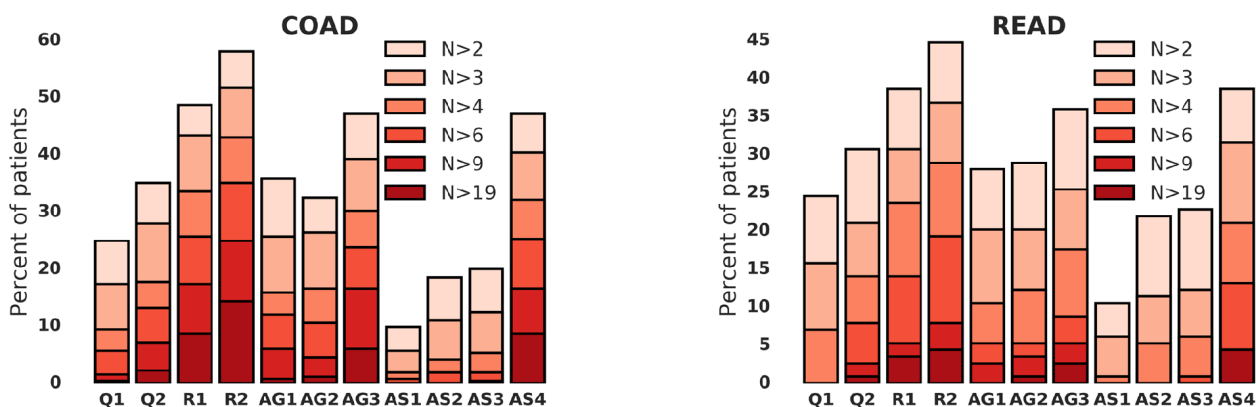
Как видно из этих данных, значительная разница между покрытием панелью всех эпитопов и эпитопов только экспрессирующихся генов видна только для больших панелей. Для средних и маленьких она минимальна. Это объясняется тем, что панели включают в себя гены с высокой экспрессией

**Таблица 3.** Данные по выявляемым соматическим мутациям, охватываемых анализируемыми панелями для аденокарциномы толстой (COAD) и прямой (READ) кишки. Молекулярные подтипы колоректального рака: CMS1 – гипермутированный; CMS2 – канонический, CMS3 – метаболический, CMS4 – мезенхимальный, UNCL – неклассифицированный образец. Приведены данные по медиане выявляемых мутаций в группах и диапазону выявляемых мутаций в индивидуальных образцах (приведено в скобках), в целом (строка “Все”) и в экспрессирующихся генах (строка “Экспр. гены”)

| Анализируемые данные |             | COAD, образцы (n)                 |                     |           | READ, образцы (n)                 |                     |           |
|----------------------|-------------|-----------------------------------|---------------------|-----------|-----------------------------------|---------------------|-----------|
|                      |             | CMS1 (58)                         | CMS2-4 + uncl (363) | Все (421) | CMS1 (4)                          | CMS2-4 + uncl (152) | Все (156) |
| Панель (сокр.)       | Мутации     | COAD, мутации: медиана (диапазон) |                     |           | READ, мутации: медиана (диапазон) |                     |           |
|                      |             | CMS1                              | CMS2-4 + uncl       | Все       | CMS1                              | CMS2-4 + uncl       | Все       |
| AG1                  | Все         | 14 (2-43)                         | 4 (0-108)           | 5         | 74 (13-117)                       | 4 (0-44)            | 4         |
|                      | Экспр. гены | 4 (0-15)                          | 2 (0-21)            | 2         | 13 (9-20)                         | 1 (0-8)             | 2         |
| AG2                  | Все         | 19 (1-62)                         | 5 (0-140)           | 5         | 101 (14-163)                      | 4 (0-60)            | 4         |
|                      | Экспр. гены | 4 (0-15)                          | 1 (0-17)            | 2         | 14 (7-18)                         | 1 (0-9)             | 1         |
| AG3                  | Все         | 70 (7-189)                        | 9 (0-499)           | 10        | 356 (52-584)                      | 8 (0-184)           | 8         |
|                      | Экспр. гены | 14 (1-57)                         | 2 (0-66)            | 2         | 42 (16-62)                        | 2 (0-19)            | 2         |
| AS1                  | Все         | 0 (0-2)                           | 1 (0-2)             | 1         | 1 (0-1)                           | 1 (0-2)             | 1         |
|                      | Экспр. гены | 0 (0-2)                           | 1 (0-2)             | 1         | 1 (0-1)                           | 1 (0-2)             | 1         |
| AS2                  | Все         | 2 (0-7)                           | 2 (0-5)             | 2         | 4 (2-7)                           | 1 (0-7)             | 1         |
|                      | Экспр. гены | 1 (0-4)                           | 1 (0-3)             | 1         | 1 (1-2)                           | 1 (0-3)             | 1         |
| AS3                  | Все         | 3 (0-14)                          | 2 (0-12)            | 2         | 10 (2-11)                         | 2 (0-9)             | 2         |
|                      | Экспр. гены | 1 (0-5)                           | 1 (0-6)             | 1         | 1 (1-2)                           | 1 (0-3)             | 1         |
| AS4                  | Все         | 56 (4-167)                        | 9 (0-432)           | 9         | 300 (46-460)                      | 8 (0-178)           | 8         |
|                      | Экспр. гены | 16 (1-53)                         | 2 (0-67)            | 3         | 50 (18-71)                        | 2 (0-21)            | 2         |
| Q1                   | Все         | 8 (0-32)                          | 4 (0-62)            | 1         | 40 (5-65)                         | 4 (0-29)            | 4         |
|                      | Экспр. гены | 1 (0-7)                           | 1 (0-8)             | 2         | 4 (3-5)                           | 1 (0-4)             | 1         |
| Q2                   | Все         | 22 (2-62)                         | 5 (0-152)           | 6         | 117 (19-158)                      | 5 (0-77)            | 5         |
|                      | Экспр. гены | 5 (0-21)                          | 2 (0-24)            | 2         | 18 (11-26)                        | 2 (0-13)            | 2         |
| R1                   | Все         | 64 (5-167)                        | 9 (0-378)           | 9         | 302 (45-475)                      | 8 (0-162)           | 8         |
|                      | Экспр. гены | 19 (0-66)                         | 3 (0-72)            | 3         | 58 (16-93)                        | 2 (0-30)            | 2         |
| R2                   | Все         | 118 (12-357)                      | 16 (0-877)          | 18        | 642 (80-956)                      | 14 (0-339)          | 14        |
|                      | Экспр. гены | 28 (1-110)                        | 4 (0-121)           | 4         | 102 (23-141)                      | 3 (0-46)            | 3         |



**Рисунок 1.** Доля мутаций пациента, охватываемая панелями, для аденокарциномы толстой (COAD) и прямой (READ) кишки. По оси абсцисс приведены сокращенные названия рассматриваемых панелей согласно таблице 1. По оси ординат – доля мутаций.



**Рисунок 2.** Процент пациентов, у которых есть как минимум N иммуногенных эпитопа в экспрессирующихся генах, где N варьирует от 3 до 20, покрытых панелями, для аденокарциномы толстой (COAD) и прямой (READ) кишки.

в различных типах рака. Как и предполагалось, количество покрытых эпитопов зависит от размера панели: чем больше генов в панели, тем больше эпитопов покрыто. Количество покрытых эпитопов при этом не превышает 10% от всех иммуногенных эпитопов как для COAD, так и для READ.

Если рассматривать только эпитопы, иммуногенные к аллелям HLA, распространенным на территории РФ (табл. S4 приложения), то характер покрытия панелями эпитопов сохраняется (рис. S1 и S2 приложения). Несмотря на то, что покрываются панелями далеко не все эпитопы, представленные TCIA для COAD и READ, большинство анализируемых панелей может быть эффективными для поиска неоантигенных эпитопов у пациентов.

Другим важным критерием оценки является количественная характеристика потенциально выявляемых эпитопов на пациента и доля пациентов с определенным клинически значимым количеством иммуногенных эпитопов. На основании литературных данных о демонстрируемой

клинической эффективности наборов иммуногенных пептидов для частных случаев терапии [9, 11] было выбрано пороговое значение, равное трём эпитопам. В качестве минимального критерия можно считать, что панель эффективна, если она дает возможность выявления для определенной доли пациентов не менее трёх экспрессирующихся эпитопов, покрытых этой панелью. Визуализация такого критерия приведена на рисунке 2. Как и в случае с анализом простого покрытия панелями неоантигенов сохраняется прямая зависимость между количеством генов (ампликонов) в панели и процентом пациентов, для которого будет выявляться не менее трёх эпитопов.

Анализ данных по такому критерию (рис. 2) показывает эффективность отбора для не менее, чем 20% пациентов в COAD при помощи всех панелей, кроме AS1-2, и не менее, чем 30% пациентов в READ при помощи всех панелей, кроме AS1-3. (табл. S2 и S3 приложения). Подобная картина сохраняется, если рассматривать эпитопы, иммуногенные к российским HLA (рис. S3 приложения).

Таким образом, все анализируемые панели, кроме AS1-3, потенциально могут быть достаточно эффективно использованы для обнаружения экспрессирующихся неоантигенных эпитопов на основании критериев, предложенных выше (покрытие мутаций в часто экспрессирующихся генах, распределение по аллелям HLA, типичных для РФ, доля пациентов с удовлетворяющим числом эпитопов). Более того, при невозможности осуществления РНК-секвенирования, например, в тех случаях, когда недоступна опухолевая РНК, применение таргетных панелей может быть наиболее предпочтительным способом получения необходимой информации о неоантигенном статусе опухоли.

Если говорить о поиске индивидуальных неоантигенных эпитопов при секвенировании внеклеточной ДНК плазмы пациента, то большие панели (R1-2, AG3, AS4) должны использоваться с осторожностью, так как не обеспечивают требуемой равномерности высокого покрытия (>500-1000) при ограниченном количестве ДНК. Полноэкзомное секвенирование в данном случае ограничено применимо из-за сложности обеспечения достаточного и равномерного покрытия таргетных локусов, выпадения определенных локусов. Так, при секвенировании внеклеточной ДНК плазмы пациентов с метастатическим раком молочной железы и метастатической саркомой с использованием прибора Illumina HiSeq 2000 для достижения необходимого для идентификации соматических мутаций покрытия отводилось минимум по одной полной дорожке на библиотеку [25]. Кроме того, при клональности опухоли мутационный профиль внеклеточной опухолевой ДНК, определенный по данным полноэкзомного секвенирования, может не совпадать с реальным профилем опухоли в случае низкой представленности отдельных клонов, и для корректной идентификации вариантов потребуются еще большее повышение покрытия, что возможно только для таргетного панельного секвенирования меньше полного экзона [26].

Безусловно, таргетные панели для неоантигенного профилирования, по нашему мнению, можно использовать в качестве разумной альтернативы РНК-секвенированию и по другим причинам. В первую очередь, исходя из экономической целесообразности. Проведенный нами анализ информативности доступных на сегодняшний день коммерческих таргетных панелей показал, что при выборе панели её размер и специализация в случае колоректального рака не являются определяющими параметрами. Так, большое количество индивидуальных неоантигенных эпитопов находится в генах, не ассоциированных с конкретным подтипом рака, а снижение количества ампликонов/генов в 5-10 раз снижает долю пациентов с потенциально обнаруживаемыми неоантигенными эпитопами всего в 2 раза (например, панели Q1, Q2 в сравнении с R1, R2).

При работе с уже выбранной панелью необходимым элементом протокола анализа является отсечка потенциальных неоантигенных эпитопов по критерию возможной экспрессии.

Мы показали, что около 1/3 неоантигенных эпитопов находится в низко- или не экспрессирующихся генах. Возможно, стоит рекомендовать использование не просто обобщённого экспрессионного фильтра под рак толстой кишки, но и с учётом локализации опухоли в разных участках толстой кишки: восходящем, поперечном и нисходящем сегменте, так как для них охарактеризованы существенные отличия в мутационных и экспрессионных профилях [28]. Учёт этих особенностей позволит оптимизировать фильтрацию кандидатных неоантигенных вариантов.

Ранее уже было показано, что единичные высокоиммуногенные эпитопы обеспечивают эффективную индивидуальную иммунотерапию, в частности, клинически эффективные клоны цитотоксических Т-клеток были выявлены для трёх иммуногенных неоэпитопов, являющихся результатом альтернативного сплайсинга в районе 1 мутации в гене *SLC3A2*, и 1 иммуногенного неоэпитопа на основе 1 мутации в гене *KIAA0368* [11]. В работе Tran и соавт. [27] введение смеси из 4-х клонов пациентских цитотоксических Т-клеток против единственного неоэпитопа на основе рекуррентной мутации *KRAS* G12D у пациента с метастатическим колоректальным раком обеспечило регрессию всех лёгочных метастазов, кроме одного, впоследствии удалённого хирургически. То есть, с определённой долей уверенности можно ожидать, что при персонализированной иммунотерапии достаточно нескольких единичных сильных пациентских неоэпитопов для достижения выраженного клинического ответа. Этот факт свидетельствует о перспективности использования компактных таргетных панелей для персонализированных решений в области иммунотерапии. В этом отношении для поиска неоантигенов колоректального рака плохо подходят малые панели в основном из-за низкого покрытия ими рекуррентных мутаций, иммуногенных эпитопов и пациентов с достаточным количеством эпитопов. Этого недостатка лишены панели средних размеров. По нашим данным, для решения таких задач при анализе аденокарциномы толстой кишки – (COAD) оптимально использование панелей Q2, R1, AG1, AG2, AG3. Для анализа образцов с аденокарциномой прямой кишки (READ) – исследованные нами панели Q2, R1 и AG3.

Неоантигенное профилирование образцов опухолевой ДНК является пока мало изученным подходом, открывающим новые перспективы для иммунотерапии рака. Мы отдаем себе отчет, что исследованные нами таргетные панели предназначены для изучения мутационного профиля опухолевой ДНК в целом и не оптимизированы для неоантигенного скрининга. Возможно, что в ближайшей перспективе специализированные таргетные панели для этих задач тоже будут доступны. Тем не менее, наш анализ показал, что и уже существующие коммерчески доступные решения тоже обладают высокой информативностью и могут быть использованы для неоантигенного профилирования.

*Приложение доступно в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).*

ЛИТЕРАТУРА

1. Drake C.G., Jaffee E., Pardoll D.M. (2006) Adv. Immunol., **90**, 51-81.
2. Hamid O. et al. (2013) N. Engl. J. Med., **369**(2), 134-144. DOI: 10.1056/NEJMoa1305133
3. Brahmer J.R. et al. (2012) N. Engl. J. Med., **366**(26), 2455-2465. DOI: 10.1056/NEJMoa1200694
4. Yarchoan M. et al. (2017) Nature Reviews Cancer, **17**(4), 209. DOI: 10.1038/nrc.2016.154
5. Cancer Genome Atlas Network (2012) Nature, **487**(7407), 330. DOI: 10.1038/nature11252
6. Song W. et al. (2018) Nature Commun., **9**(1), 2237. DOI: 10.1038/s41467-018-04605-x
7. Le D.T. et al. (2015) N. Engl. J. Med., **372**(26), 2509-2520. DOI: 10.1056/NEJMoa1500596
8. Parkhurst M.R. et al. (2011) Mol. Ther. American Society of Gene Cell Therapy, **19**(3), 620. DOI: 10.1038/mt.2010.272
9. Ott P.A. et al. (2017) Nature, **547**(7662), 217. DOI: 10.1038/nature22991
10. Yadav M. et al. (2014) Nature, **515**(7528), 572. DOI: 10.1038/nature14001
11. Zacharakis N. et al. (2018) Nature Medicine, **24**, 724-730. DOI: 10.1038/s41591-018-0040-8
12. Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Nature, **507**(7492), 315. DOI: 10.1038/nature12965
13. Cancer Genome Atlas Research Network (2013) Nature, **499**(7456), 43. DOI: 10.1038/nature12222
14. Manier S. et al. (2016) Blood, **128**(22), 197.
15. Frattini M. et al. (2004) Clin. Cancer Res., **10**(12), 4015-4021. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0031
16. <https://portal.gdc.cancer.gov/legacy-archive/files/3437ecf9-355d-4d35-afb4-ffe1a705c206>
17. <https://portal.gdc.cancer.gov/legacy-archive/files/7c3e8456-c39f-4292-8cc2-374b14c75446>
18. Charoentong P. et al. (2017) Cell Reports, **18**(1), 248-262. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.019
19. Gonzalez-Galarza F.F. et al. (2010) Nucleic Acids Res., **39**(suppl\_1), D913-D919. DOI: 10.1093/nar/gkq1128
20. Jurtz V. et al. (2017) J. Immunol., **ji1700893**. DOI: 10.4049/jimmunol.1700893
21. Quinlan A.R., Hall I.M. (2010) Bioinformatics, **26**(6), 841-842. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq033
22. Dravis C. et al. (2018) Cancer Cell. DOI: 10.2139/ssrn.3155661
23. Giannakis M. et al. (2014) Nature Genetics, **46**(12), 1264. DOI: 10.1038/ng.3127
24. Guinney J. et al. (2015) Nature Medicine, **21**(11), 1350. DOI: 10.1038/nm.3967
25. Butler T.M. et al. (2015) PloS One, **10**(8), e0136407. DOI: 10.1371/journal.pone.0136407
26. Chicard M. et al. (2018) Clin. Cancer Res., **24**(4), 939-949. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1586
27. Tran E. et al. (2016) N. Engl. J. Med., **275**(23), 2255-2262. DOI: 10.1056/NEJMoa1609279
28. Salem M. et al. (2017) Oncotarget, **49**(8), 86356-86368. DOI: 10.18632/oncotarget.21169

Поступила: 22. 11. 2018.  
Принята к печати: 29. 11. 2018.

TARGETED GENE SEQUENCING PANELS: APPLICABILITY FOR NEOANTIGEN PROFILING OF COLON AND RECTAL ADENOCARCINOMA

A.V. Kanygina<sup>1\*</sup>, E.I. Sharova<sup>1</sup>, R.I. Sultanov<sup>1</sup>, Y.A. Schelygin<sup>2</sup>, Y.V. Doludin<sup>3</sup>, E.S. Kostyukova<sup>1</sup>, E.V. Generozov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,  
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; \*e-mail: kanygina@rcpcm.org

<sup>2</sup>State Scientific Center of Coloproctology, 2 Salyam Adyl str., Moscow, 123423 Russia

<sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8 Trubetskaya str., Moscow, 119991 Russia

Cancer immunotherapy represents a promising and rapidly developing approach for the treatment of oncological diseases. Among the methods of personalized adjuvant immunotherapy, neoantigenic peptide-based drugs have demonstrated substantial efficiency. These drugs are designed to target mutant proteins arising from somatic alterations in the genome of tumor cells and thus stimulate immune response against tumor tissues. The methods of individual screening for potentially immunogenic mutations are mostly based on next-generation exome sequencing of tumor samples, which is a complex and costly procedure for clinical application. Targeted gene sequencing panels limited to a certain set of genes represent a reasonable alternative to WES. Targeted sequencing is also more efficient when there is a low amount of the sample DNA available. We have estimated the potential efficiency of targeted oncological panels in terms of somatic neoantigen profiling in colorectal cancer (colon and rectal adenocarcinoma). The clinical practice of identification of frequent somatic variants does not provide enough data for designing an efficient personalized drug when applied to low and medium mutated cancers such as colorectal cancer. Our analysis of 11 commercially available panels containing different number of genes has shown that neither the larger size of a panel nor its initial customization for colorectal cancer provides a significantly better estimation of an individual somatic mutation profile. The optimal approach is to use the general-purpose medium-sized cancer panels (2300-11200 amplicons and/or 150-600 genes). These panels allow to detect a sufficient number of immunogenic epitopes (>3) per patient for over 30-50% of patients.

**Key words:** colorectal cancer; neoantigens; immunotherapy; sequencing; targeted panels